



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

Veröffentlichungsnummer:

0 297 291  
A2

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 88108609.4

(51) Int. Cl.<sup>4</sup> C12N 15/00 , A61K 39/104 ,  
C12Q 1/68 , G01N 33/577

(22) Anmeidetag: 30.05.88

Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat: ES.

(30) Priorität: 03.06.87 DE 3718591

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
04.01.89 Patentblatt 89/01

(34) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: BEHRINGWERKE  
Aktiengesellschaft  
Postfach 1140  
D-3550 Marburg 1(DE)

(72) Erfinder: Domdey, Horst, Dr.  
Fasanenweg 6  
D-8027 Neuried(DE)  
Erfinder: Lottspeich, Friedrich, Dr.  
Drosselweg 1  
D-8027 Neuried(DE)  
Erfinder: von Specht, Bernd-Ulrich, Prof. Dr.  
Am Waldweg  
D-8193 Ambach(DE)  
Erfinder: Duchene, Michael, Dr.  
Gabelsbergerstrasse 59  
D-8000 München 2(DE)

(74) Vertreter: Meyer-Dulheuer, Karl-Hermann, Dr.  
et al  
HOECHST Aktiengesellschaft Zentrale  
Patentabteilung Postfach 80 03 20  
D-6230 Frankfurt/Main 80(DE)

(54) Äusseres Membranprotein F von Pseudomonas aeruginosa.

(57) Das Gen für das äußere Membranprotein F (OMP F) von Pseudomonas aeruginosa wurde isoliert, sequenziert und exprimiert. Dadurch wird OMP F und immunogene Teilsequenzen in der Menge und Reinheit gewonnen, die für einen Einsatz zur Herstellung Impfstoffen erforderlich ist.

A2

EP 0 297 291

### Äußeres Membranprotein F von *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* ist ein ubiquitär vorkommender Mikroorganismus, der in der Humanmedizin als "Problemkeim" bekannt ist. Er befällt in erster Linie geschwächte Patienten und ist häufig durch Antibiotikatherapie nur schwer zu bekämpfen. Besonders gefährdet sind deshalb Patienten auf Intensivstationen und Querschnittsgelähmte sowie Menschen, die Verbrennungen erlitten oder der Gefahr von Verbrennungen ausgesetzt sind, wie Feuerwehrleute und Stahlarbeiter.

W.A. Woodruff et al., J. Bacteriol. 167 (1986) 473-479 beschreiben die Expression des äußeren Membranproteins F (Outer Membrane Protein F, OMPF, Porin F) in *E. coli*, wobei ein nicht näher definierter Stamm *P. aeruginosa* PAO1 als Ausgangsstamm diente. Die klonierten DNA-Sequenzen sind nur durch sehr grobe Restriktionskarten charakterisiert: es sind weder DNA-Sequenzen noch Aminosäure-Teilsequenzen angegeben und es wird auch auf keine Hinterlegung des klonierten Materials bei einer anerkannten Hinterlegungsstelle verwiesen.

Der Erfindung liegt die komplette Charakterisierung des Gens für OMPF aus *P. aeruginosa*, Serotyp 6, ATCC 33354, zugrunde. Die DNA-Sequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind in der Tabelle wiedergegeben, wobei die Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode unter den betreffenden Triplets angeordnet ist und das Signalpeptid durch kursive Buchstaben hervorgehoben ist.

Hierzu wurden aus dem genannten Stamm die Proteine der äußeren Membran gewonnen und daraus mittels HPLC das OMPF angereichert. Der Aminotermus und durch Spaltung mit Trypsin erhaltenen Proteinfragmente wurden ansequenziert. Aus verschiedenen dieser Oligopeptide wurden dafür kodierende DNA-Sequenzen abgeleitet und diese Oligodesoxynukleotide chemisch synthetisiert. Weiterhin wurde aus dem Stamm genomische DNA isoliert, gereinigt und mit dem Restriktionsenzym Sau3A partiell verdaut. DNA-Fragmente von etwa 15 bis 20 kb wurden angereichert und in den  $\lambda$ -Phagen EMBL 3 (A.-M. Frischaufer et al., J. Mol. Biol. 170 (1983) 827-842; R.W. Hendrix et al. (Eds.), Lambda II, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1983), kloniert. Die so erhaltene Genbank wurde mit den synthetisierten Oligodesoxynukleotiden auf komplementäre Sequenzen abgesucht. Aus einem der gefundenen positiv reagierenden Phagen-Klonen wurde das Gen für OMPF auf einem 15 kb-Fragment gefunden. Auf diesem Fragment und auf weiteren gefundenen Fragmenten konnte das Gen auf einem 2.5 kb PstI-Fragment einge-

grenzt werden. Es zeigte sich jedoch, daß dieses Fragment nicht in einen "high copy number"-Vektor kloniert werden konnte, da das Genprodukt offensichtlich für die Wirtszelle toxisch ist. Das Gen wurde deshalb in zwei überlappenden Teilstücken mit einem Überlappungsbereich von etwa 500 bp subkloniert. Aus den beiden Subklonen wurde die DNA-Sequenz des OMPF-Gens und der angrenzenden Bereiche bestimmt. Beide DNA-Stränge des Gens wurden vollständig (nach der Methode von Sanger) sequenziert. Aus der so erhaltenen DNA-Sequenz wurde die entsprechende Aminosäuresequenz abgeleitet. Die Aminosäuresequenzen aller Oligopeptide, die durch tryptische Spaltung des Proteins erhalten worden waren, konnten eindeutig zugeordnet werden. Das 5'-Ende der OMPF-mRNA wurde durch S1-Analyse und reverse Transkription der mRNA ermittelt.

Die Charakterisierung des Gens erlaubt nunmehr die Herstellung von OMPF und immunogenen Teilsequenzen dieses Proteins in der Menge und Reinheit, die für einen Einsatz zur Herstellung von Impfstoffen erforderlich ist.

Die Erfindung betrifft somit das OMPF mit der Aminosäuresequenz gemäß Tabelle, die dafür kodierende DNA, deren Protein kodierender Strang in der Tabelle dargestellt ist, immunogene Teilsequenzen von OMPF, mit OMPF und immunogenen Teilsequenzen dieses Proteins gewonnene polyklonale und monoklonale Antikörper und die entsprechenden Seren sowie Diagnostika, die solche Antikörper oder entsprechende Nukleotidsequenzen enthalten und Diagnosizerverfahren unter Verwendung solcher Diagnostika.

Darüber hinaus eröffnet die Erfindung einen Weg zur passiven Immunisierung mit humanen monoklonalen Antikörpern. Die Erfindung betrifft deshalb auch die Verwendung von erfindungsgemäß gewonnenen Antigenen zur Induzierung von Lymphozyten zur Produktion entsprechender monoklonaler Antikörper bzw. zum Testen von Lymphozyten auf die Produktion solcher Antikörper.

Die Aufarbeitung, Reinigung, Immunisierung und Gewinnung der Seren bzw. Antikörper kann nach an sich bekannten Methoden erfolgen. Verwiesen sei beispielsweise auf M.E. Gilletland et al., Infection and Immunity 44 No. 1 (Apr. 1984) 49-54; R.E.W. Hancock et al., J. Infectious Diseases 149 No. 2 (Feb. 1984) 220-226; S. Sawada et al., J. Infectious Diseases 150 No. 4 (Oct. 1984) 570-576.

Die Erfindung wird in den folgenden Beispielen näher erläutert. Teile und Prozentangaben beziehen sich auf das Gewicht, wenn keine anderen Angaben gemacht sind.

**Beispiel 1:****Gewinnung von OMPF und tryptischer Fragmente**

Die äußeren Membranproteine von *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 33354 werden nach der Methode von Mizuno und Kageyama (J. Biochem. 86, 979-989, 1979) isoliert. Die Bakterienkulturen werden in der spät-logarithmischen Wachstumsphase geerntet, in 10 mM Na-Phosphat (pH 7,2; "Aufschlußpuffer") suspendiert und mit Glasperlen im Homogenisator (©Waring-Blender) bei 4 °C 5 min aufgeschlossen. Die Zellwände werden durch 60-minütige Zentrifugation bei 100 000 g bei 4 °C pelletiert und noch zweimal mit dem Aufschlußpuffer gewaschen. Pro 150 g Naßgewicht *Pseudomonas* werden zum Pellet 400 ml SDS-Puffer (2 % SDS, 10 % Glycerin, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8) zugegeben und bei 30 °C 60 min gerührt. Danach wird 60 min bei 100 000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wird nochmals mit der halben Menge SDS-Puffer extrahiert und erneut zentrifugiert. Die lösliche Fraktion wird verworfen. Der unlösliche Niederschlag wird mit 300 ml NaCl-SDS-Puffer (2 % SDS, 10 % Glycerin, 0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8) 60 min bei 30 °C gerührt. Anschließend wird 60 min bei 100 000 g und 25 °C zentrifugiert. Das Pellet wird zweimal bei 4 °C mit H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen. Die unlösliche Fraktion enthält hauptsächlich die Proteine F und H<sub>2</sub> und kleine Mengen an Protein I.

1 mg der äußeren Membranproteine werden in 1 ml 20 % Ameisensäure/6 M Harnstoff gelöst und an TSK 3000 (LKB) in Portionen zu 150 µl in 20 % Ameisensäure chromatographiert (Flußrate 1 ml/min). Das unter diesen Bedingungen in den Proteinfraktionen erhaltene Material wird gepoolt und zeigt in der SDS-Gelelektrophorese eine einheitliche Bande, die im Molekulargewicht OMPF entspricht.

Dieses Material wird gefriergetrocknet, in 200 µl 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) aufgenommen und mit 20 µg (mit L-1-Tosylamid-2-phenylethyl-chlormethylketon behandeltem) Trypsin-TPCK (Cooper Biochemical GmbH) 18 Std. bei 37 °C gespalten. Das Spaltgemisch wird mit Ameisensäure auf pH 3,5 gebracht und über "Reversed Phase"-Hochdruckflüssigkeitschromatographie fraktioniert.

**Chromatographiebedingungen:**

Säule: ©Vydac TPRP-18 (10 µm), 250 x 4 mm (Chrompack)

5

**Lösungsmittelsystem:**

10 Lösungsmittel A: 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (Fluka, z. Sequenzanalyse) in Wasser  
Lösungsmittel B: 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in Acetonitril (E. Merck, ©Lichrosolv)

15 Gradient von 0 % B bis 70 % B in A in 70 min  
Flußrate: 1,5 ml/min  
Raumtemperatur

Die erhaltenen Peptidfragmente werden zum Teil durch Aminosäureanalyse und Sequenzanalyse charakterisiert. Einige der erhaltenen Peakfraktionen werden nach Rechromatographie an TSK 2000 in 0,1 % Trifluoressigsäure auf einem Gasphasensequenzer (Applied Biosystems 470 A) analysiert. Die Phenylhydantoin-Aminosäurederivate werden mit Hilfe eines isokratischen HPLC-Systems (Lottspeich, J. Chromatography 326, 321-327, 1985) identifiziert.

**Beispiel 2:**

30

**Gewinnung und Charakterisierung der OMPF-DNA**

35

Konstruktion einer Genbank von *Pseudomonas aeruginosa*:

λ EMBL3-Arme werden nach Maniatis et al. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Publications 1982) präpariert. *P. aeruginosa*-DNA wird aus einer 500 ml Kultur isoliert (Rodriguez and Tait, Recombinant DNA Techniques, Addison-Wesley, 1983). 20 x 10 µg DNA werden mit dem Restriktionsenzym Sau3A partiell gespalten und durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation (Maniatis et al., s.o.) fraktionsiert. Fragmente mit einer Größe von 15-20 kb werden mit λ EMBL3-Armen ligiert (Maniatis et al., s.o.). Diese ligierte DNA wird in Phagenpartikel (Amersham) verpackt. Pro µg DNA werden 2 x 10<sup>6</sup> rekombinante Phagen erhalten.

"Screenen" der Genbank nach OMPF-Sequenzen:

Rekombinante Phagen werden mit einer Dichte von 500 pfu auf einem NM539-Bakterienrasen ausplattiert. Phagenplaques werden nach der Methode von Benton und Davies (Science 196, 180-182, 1977) auf Nylon-Membranen übertragen. Durch Hybridisierung mit den Oligonukleotiden

5

AAC TC TTA GGCC TGAC TTTC TATGAA 3' und 5' TCNGCA GTTC TTTCATAGAA 3'. welche nach den Peptidsequenzen NLADFMK und NMKNAD synthetisiert wurden, werden aus 2500 rekombinanten Phagenplaques 6 positive Kandidaten isoliert.

Sequenzanalyse des OMPF-Gens und seiner flankierenden Bereiche:

Von einem der isolierten Phagen wird eine Großkultur (1l) gezüchtet und daraus DNA präpariert (Maniatis et al., s.o.). Diese wird mit den Restriktionsenzymen Sall und Sau3A (partiell) gespalten. Die erhaltenen Restriktionsfragmente werden "shotgun" in pUC18 und pUC19 (Yanisch-Perron et al., Gene 33, 103-119, 1985) subkloniert. Aus hybridisierungspositiven Klonen wird Plasmid-DNA isoliert und diese nach weiterer Subklonierung, bzw. Exo III- und Exo VII-Verdauung (Yanisch-Perron et al., s.o.) nach der Methode von Chen und Seburg (DNA 4, 165-170, 1985) sequenziert.

### Beispiel 3:

### Expression von OMPF

Da die Expression von OMPF in E. coli toxisch für die Bakterien ist, sofern das Strukturgens auf einem "medium copy"- (pBR322) oder "high copy"- (pUC-Plasmid) Vektor unter der Kontrolle des eigenen Promotors vorliegt, wird das Strukturgens zunächst unter die Kontrolle eines induzierbaren Promotors gebracht. Ein Teilfragment des OMPF-Gens, welches den Promotor und den 5'-terminalen Teil des Strukturgens enthält, wird als Sall-Restriktionsfragment in Sall-geschnittene M13mp19 doppelsträngige DNA (Yanisch-Perron, s.o.) ligiert, und damit nach Standardbedingungen (Hanahan, J. Mol. Biol. 166, 557-580, 1983) E. coli JM109 (Yanisch-Perron et al., s.o.) transformiert. Aus einer 5 ml Flüssigkultur transformierter Bakterien werden aus dem Überstand Phagen gewonnen und daraus wird einzelsträngige DNA präpariert. Nach der Methode von Newman et al. (Cell 42, 335-344, 1985) wird mit Hilfe eines Oligodesoxy-nucleotids eine gezielte Mutagenese an dieser einzelsträngigen DNA durchgeführt, um direkt vor dem ATG-Translationsinitiationscodon eine EcoRI-Restriktionsschnittstelle einzuführen, d.h. die Sequenz ATTTAACGGATG (Nucleotide 55-66 in Tabelle 1) wird in die Sequenz ATTGAATTCTATG umgewandelt. Aus diesem neuen Konstrukt wird nun der 5'-terminale Teil des Strukturgens herausgeschnitten und unter die Kontrolle des induzierbaren tac-Promotors (de Boer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 21 ff. 1983) gebracht. Zu diesem Zweck wird das EcoRI-Sall-Fragment in die

5 EcoRI- und Sall-Schnittstellen des Vektors pKK223-3 (Pharmacia) ligiert. Dieses klonierte Zwi-schenprodukt wird mit Sall und PstI geschnitten und in diese Schnittstellen wird der restliche Teil des OMPF-Strukturgens inklusive Terminatorregion als Sall-PstI-Fragment eingebracht. Das OMPF-Strukturgens steht nun unter der Kontrolle des induzierbaren tac-Promotors. Durch Zugabe von IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid) zu der Kultur transformierter Zellen (JM105, Yanisch-Perron et al., s.o.) wird der tac-Promotor dereprimiert und damit die Expression von OMPF induziert.

### Beispiel 4:

### Herstellung von Antiseren

20 Gesunde Erwachsene, die in ihrer Krankheitsgeschichte keine Allergien, Diabetes, Immundefizienz-Krankheiten, Anämien oder Hautkrankheiten aufweisen, werden mit heterolog exprimiertem OMPF, bzw. Teilesequenzen davon, immunisiert. Die Vaccinierung erfolgt an den Tagen 1, 8, und 15. Drei Wochen nach der letzten Injektion wird den freiwilligen Kandidaten Blut entnommen und dieses auf Hepatitis B-Oberflächenantigen sowie auf HIV-Antigene getestet. Nur negativ reagierende Plasmaspenden werden gepoolt, unter kontrollierten sterilen Bedingungen fraktioniert und abgepackt.

### Beispiel 5:

### Herstellung von monoklonalen Antikörpern

40 Gereinigtes OMPF, bzw. OMPF-Teilpeptide davon, werden in Freunds Adjuvans oder Al(OH)<sub>3</sub>, Balb/c-Mäusen intraperitoneal injiziert. Nach 6 Wochen wird mit gelöstem Antigen "geboostet". Der Antikörpertiter wird eine Woche später durch ELISA-Tests bestimmt. Bei unzureichender Immunreaktion erfolgen weitere Injektionen. 3 Tage vor der Zellfusion werden die Mäuse mit 10 µg des gelösten Antigens intravenös "geboostet". Die Milzzellen werden nach Standardmethoden (nach Köhler und Milstein) mit NS1-Zellen fusioniert. Nach Selektion in HAT-Medium wachsen in den Mikronäpfen einzelne Kolonien aus, deren Kulturergebnisse wiederum im ELISA auf Antikörper gegen OMPF getestet werden. Positive Kolonien werden subkloniert.

Die Antikörper werden aus Kulturüberständen und aus in Balb/c-Mäusen induzierten Asciten gewonnen, nach gängigen biochemischen Methoden gereinigt und charakterisiert.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

5

Tabelle

GCCACCCAAGTTGTGCGGTGATTGTTGGACAACTAAC TGACC ATCAAGATGGGGATTTAA  
 CGGATGAAA CTGAAGAACACCTTAGGC GTTGT CATCGGCTCGCTGGT GCGCTTCGGCA  
 H K L K N F L G V V J G S L V A A S A  
 ATGAACGCC TTGCCCAGGGCCAGAAC TCGGTAGAGATCGAAGCCTCGGCAAGCGCTAC  
 H N A F A Q G Q N S V E I E A F G K R Y  
 TTCACCGACAGCGTTCGCAACATGAAGAACGCTGACCTGTACGGCGGCTCGATCGGCTAC  
 F T D S V R N M K N A D L Y G G S I G Y  
 TTCCTGACCGACGACGTGAGCTGGCTCTGCTCACGGTGAGTACCA CGATGTTCGTGGC  
 F L T D D V E L A L S Y G E Y H D V R G  
 ACCTACGAAACCGGCAACAAGAACAGGTCCATGGCAACCTGACCTCCCTGGACGCCATCTAC  
 T Y E T G N K K V H G N L T S L D A I Y  
 CACTTCGGTACCCCGGGCGTAGGTCTCGTCCGTACGTGTCGGCTGGTCTGGCTCACCA G  
 H F G T P G V G L R P Y V S A G L A H Q  
 AACATCACCAACATCAACAGCGACAGCCAAGGCCGTACGAGATGACCATGGCAACATC  
 N I T N I N S D S Q G R Q Q M T M A N I  
 GGC GCTGGTCTGAAGTACTACTTCACCGAGAACTTCTCGCCAAGGCCAGCCTCGACGGC  
 G A G L K Y F T E N F F A K A S L D G  
 CAGTACGGCC TGGAGAAGCGTGACAACGGTCA CCAGGGTGAGTGGATGGCTGGCTGGG C  
 Q Y G L E K R D N G H Q G E W M A G L G  
 GTCGGCTTCAACTTCGGTGGTTCGAAAGCCGCTCCGGCTCCGGAACCGGTTGCCGACGTT  
 V G F N F G G S K A A P A P E P V A D V  
 TGCTCCGACTCCGACAACGACGGCGTCTGCACACGTCGACAAGTGCCGGACACCCCG  
 C S D S D N D G V C D N V D K C P D T P  
 GCCAACGTCA CCGTTGACGCCAACGGCTGCCGGCTGCGCCGAAGTCGTACCGTACAG  
 A N V T V D A N G C P A V A E V V R V Q  
 CTGGACGTGAAGTTGACTTCGACAAAGTCAAGGTCAAAGAGAACAGCTACGCTGACATC  
 L D V K F D F D K S K V K E N S Y A D I  
 AAGAACCTGGCCGACTTCATGAAGCAGTACCCGTCCACTTCCACCA ACCCGTTGAAGGTCA T  
 K N L A D F M K Q Y P S T S T T V E G H  
 ACCGACTCCGTGGTACCGACGCTTACAACCAGAACGCTGTCCGAGCGTGGTGC CAACGCC  
 T D S V G T D A Y N Q K L S E R R A N A  
 GTTCGTGACGTACTGGTCAACGAGTACGGTGGAAAGGTGGTGC GTGAACGCTGTGGT  
 V R D V L V N E Y G V E G G R V N A V G  
 TACGGCGAGTCCC GCGGTTGCCGACAACGCCACCGCTGAAGGCCGCGCTATCAACCGT  
 Y G E S R P V A D N A T A E B G R A I N R  
 CGCGTTGAAGCCGAAGTAGAACGCCGAAGCCAAGTAATCGGCTGAGCCTTCAAAGAAAAAC  
 R V E A E V E A B A K \*  
 CGGGCCAGGCCGGTTTTCTTGCCTGGAAAAAGACCGCTCGTCAGGCCCTCAGGGAAA  
 CGGGTTGCACGATGCCGCGGCCACTCGCCGATCTGGTGCACCTGCAG

**Ansprüche**

1. Äußeres Membranprotein F (OMPf) vom *Pseudomas aeruginosa* mit der Aminosäuresequenz gemäß Tabelle. 5
2. Immunogene Teilesequenzen des in Anspruch 1 definierten OMPf. 10
3. DNA, kodierend für OMPf, mit der DNA-Sequenz (codierender Strang) gemäß Tabelle. 15
4. Vektoren und DNA-Strukturen, die die DNA nach Anspruch 3 oder Teile davon enthalten. 20
5. Pro- oder eukaryotische Zellen, die Vektoren oder DNA-Strukturen nach Anspruch 4 enthalten. 25
6. Polyclonale und monoklonale Antikörper sowie die entsprechenden Seren, erhalten unter Verwendung von OMPf gemäß Anspruch 1 und immunogener Teilesequenzen dieses Proteins als Antigen. 30
7. Diagnostikum, enthaltend Antikörper nach Anspruch 6. 35
8. Diagnostikum, das die Nukleotidsequenz gemäß Anspruch 3 ganz oder teilweise oder eine davon abgeleitete Nukleotidsequenz enthält. 40
9. Diagnostizierverfahren unter Verwendung eines Diagnostikums nach Anspruch 7 oder 8. 45
10. Verwendung eines Proteins nach Anspruch 1 oder 2 zur Induzierung von Lymphozyten zur Produktion von Antikörpern. 50
11. Verwendung eines Proteins nach Anspruch 1 oder 2 zum Testen von Lymphozyten auf die Produktion von Antikörpern gegen solche Proteine. 55

Patentansprüche für den folgenden Vertragsstaat :  
ES

1. Verfahren zur Expression des äußeren Membranproteins F (OMPf) oder immunogener Teile davon, dadurch gekennzeichnet, daß die gemäß Tabelle für OMPf kodierende cDNA in geeignete Vektoren gebracht wird, damit pro-oder eukaryotische Zellen transformiert werden und die cDNA in diesen Transformanten exprimiert wird. 40
2. Verfahren zur Herstellung polyclonaler oder monoklonaler Antikörper gegen OMPf, dadurch gekennzeichnet, daß OMPf oder immunogene Teile davon zur Immunisierung eingesetzt werden. 45
3. Verfahren zur Herstellung von Diagnostika, dadurch gekennzeichnet, daß nach Anspruch 2 hergestellte Antikörper eingesetzt werden. 50
4. Verfahren zur Herstellung von Diagnostika, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleotidsequenz gemäß Tabelle oder Teile davon eingesetzt wird. 55

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



(19) Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 297 291  
A3

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 88108609.4

(51) Int. Cl.4: C12N 15/00 , A61K 39/104 ,  
C12Q 1/68 , G01N 33/577

(22) Anmeldetag: 30.05.88

(30) Priorität: 03.06.87 DE 3718591

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
04.01.89 Patentblatt 89/01

(60) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB IT LI LU NL SE

(86) Veröffentlichungstag des später veröffentlichten  
Recherchenberichts: 29.03.89 Patentblatt 89/13

(71) Anmelder: BEHRINGWERKE  
Aktiengesellschaft  
Postfach 1140  
D-3550 Marburg 1(DE)

(72) Erfinder: Domdey, Horst, Dr.  
Fasanenweg 6  
D-8027 Neuried(DE)  
Erfinder: Lottspeich, Friedrich, Dr.  
Drosselweg 1  
D-8027 Neuried(DE)  
Erfinder: von Specht, Bernd-Ulrich, Prof. Dr.  
Am Waldweg  
D-8193 Ambach(DE)  
Erfinder: Duchene, Michael, Dr.  
Gabelsbergerstrasse 59  
D-8000 München 2(DE)

(74) Vertreter: Meyer-Dulheuer, Karl-Hermann, Dr.  
et al  
HOECHST Aktiengesellschaft Zentrale  
Patentabteilung Postfach 80 03 20  
D-6230 Frankfurt/Main 80(DE)

(54) Äusseres Membranprotein F von Pseudomonas aeruginosa.

(57) Das Gen für das äußere Membranprotein F  
(OMPf) von Pseudomonas aeruginosa wurde isoliert,  
sequenziert und exprimiert. Dadurch wird OMPf und  
immunogene Teilsequenzen in der Menge und Rein-  
heit gewonnen, die für einen Einsatz zur Herstellung  
Impfstoffen erforderlich ist.

EP 0 297 291 A3



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE						
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betritt Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)			
D,X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 105, Nr. 15, 13. Oktober 1986, Seite 212, Ref.Nr. 128784n; Columbus, Ohio, US W.A. WOODRUFF et al.: "Expression in Escherichia coli and function of Pseudomonas aeruginosa outer membrane porin protein F." & J. BACTERIOL. 1986, 167(2), 473-9  * Zusammenfassung *	1-5, 8, 9	C 12 N 15/00 A 61 K 39/104 C 12 Q 1/68 G 01 N 33/577			
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 107, Nr. 7, 17. August 1987, Seite 566, Ref. Nr. 57059h; Columbus, Ohio, US; J.M. MATTHEWS-GREER et al.: "Outer membrane protein F (porin) preparation of Pseudomonas aeruginosa as a protective vaccine against heterologous immunotype strains in a burned mouse model" & J. INFECT. DIS. 1987, 155(6), 1282-91  * Zusammenfassung *	1, 2, 10, 11	RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int. Cl. 4)  C 12 N A 61 K			
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS/RRM, Ref.Nr. 27016703; Philadelphia, US; P.A. SOKOL et al.: "Cloning and expression of the Pseudomonas aeruginosa porin gene in Escherichia coli" & ABSTR. ANN. MEET. AM. SOC. MICROBIOL. (USA) 1984, 84(O), Abstr. D72  * Zusammenfassung *	1-5, 8, 9				
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.</p> <table border="1"> <tr> <td>Recherchenort DEN HAAG</td> <td>Abschlußdatum der Recherche 07-12-1988</td> <td>Prüfer SKELLY</td> </tr> </table> <p><b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b></p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p> <p>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument</p> <p>&amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>				Recherchenort DEN HAAG	Abschlußdatum der Recherche 07-12-1988	Prüfer SKELLY
Recherchenort DEN HAAG	Abschlußdatum der Recherche 07-12-1988	Prüfer SKELLY				



## GEBÜHRENPLICHTIGE PATENTANSPRÜCHE

Die vorliegende europäische Patentanmeldung enthielt bei ihrer Einreichung mehr als zehn Patentansprüche.

- Alle Anspruchsgebühren wurden innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.
- Nur ein Teil der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn sowie für jene Patentansprüche erstellt für die Anspruchsgebühren entrichtet wurden,  
nämlich Patentansprüche:
- Keine der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn Patentansprüche erstellt.

## X MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung; sie enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen,  
nämlich:

1. Patentansprüche 1-5, 8, 10, 11 und 9 teilweise:  
DNS kodierende für OMPF von Pseudomonas aeruginosa, und ihre Verwendung als Diagnostika oder Vakzin
2. Patentansprüche 6, 7 und 9 teilweise:  
Polyklonale und monoklonale Antikörper gegen OMPF



All die weiteren Recherchengebühren wurden innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.



Nur ein Teil der weiteren Recherchengebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf Erfindungen beziehen, für die Recherchengebühren entrichtet worden sind.

nämlich Patentansprüche:



Keine der weiteren Recherchengebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf die zuerst in den Patentansprüchen erwähnte Erfindung beziehen.

nämlich Patentansprüche:

- 2 -

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE

Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betritt Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
X	INFECTION AND IMMUNITY, Band 44, Nr. 1, April 1984, Seiten 49-54; Am. Soc. for Microbiology, US; H.E. GILLELAND Jr. et al.: "Use of a purified outer membrane protein F (porin) preparation of <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> as a protective vaccine in mice"  * Insgesamt *  --	1, 2, 10, 11	
P, X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 108, Nr. 25, 20. Juni 1988, Seite 143, Ref. Nr. 217037a; Columbus, Ohio, US; M. DUCHENE et al.: "Sequence and transcriptional start site of the <i>Pseudomonas aeruginosa</i> outer mem- brane porin protein F gene" & J. BACTERIOL. 1988, 170(1), 155-62  * Zusammenfassung *	1-5, 8- 11	RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int. Cl. 4)
P, X	INFECTION AND IMMUNITY, Band 56, Nr. 5, May 1988, Seiten 1017-1022; Am. Soc. for Microbiology, Washington, US; H.E. GILLELAND Jr. et al.: "Outer membrane protein F preparation of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> as a vaccine against chronic pulmonary infection with heterologous immunotype strains in a rat model"  * Insgesamt *	1, 2, 10, 11	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			./..
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : handschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmelddatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument		



- 3 -

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE

Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betritt Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 103, Nr. 9, 2. September 1985, Seite 493, Ref. Nr. 69460n; Columbus, Ohio, US; R.E.W. HANCOCK et al.: "Immunotherapeutic potential of monoclonal antibodies against Pseudomonas Aeruginosa protein F" & EUR. J. CLIN. MICROBIOL. 1985, 4(2), 224-7  * Zusammenfassung * --	6,7,9	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 103, Nr. 1, 8. Juli 1985, Seite 433, Ref.Nr. 4711a; Columbus, Ohio, US; L.M. MUTHARIA et al.: "Characterization of two surface-localized antigenic sites on porin protein F of Pseudomonas aeruginosa" & CAN. J. MICROBIOL. 1985, 31(4), 381-6  * Zusammenfassung * --	6,7,9	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 101, Nr. 25, 17. Dezember 1984, Seite 586, Ref.Nr. 228262b; Columbus, Ohio, US S. SAWADA et al.: "Protection against infection with Pseudomonas aeruginosa by passive transfer of monoclonal antibodies to lipopolysaccharides and outer membrane proteins" & J. INFECT. DIS. 1984, 150(4), 570-6  * Zusammenfassung * --	6,7,9	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			./...
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze			
E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmelde datum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			



# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 88 10 8609

- 4 -

## EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE

Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrift Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
X	INFECTION AND IMMUNITY, Band 54, Nr. 1, Oktober 1986, Seiten 239-244; Am. Soc. for Microbiology, US; J.E. PENNINGTON et al.: "Polyclonal and monoclonal antibody therapy for experimental Pseudomonas aeruginosa pneumonia"  * Insgesamt * --	6,7,9	
X	INFECTION AND IMMUNITY, Band 42, Nr. 3, Dezember 1983, Seiten 1027-1033; Am. Soc. for Microbiology, US; L.M. MUTHARIA et al.: "Surface localization of Pseudomonas aeruginosa outer membrane porin protein F by using monoclonal antibodies"  * Insgesamt * --	6,7,9	
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS/RRM, Ref.Nr. 25071807; Philadelphia, US; D.R. COOK et al.: "Detection of Pseudomonas aeruginosa antigen in serum using a PAN reactive monoclonal antibody" & CLIN. INVEST. MED. 1982, 5(2-3), 31B  * Zusammenfassung * -----	6,7,9	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
X : KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN Y : von besonderer Bedeutung allein betrachtet A : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie O : technologischer Hintergrund P : nichtschriftliche Offenbarung T : Zwischenliteratur E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			